

巨尾桉种质胶丸常温保存生理生化研究*

曹月华

摘要 在保存 9 个月中, 检测了包于胶丸内巨尾桉节段(种质)呼吸速率、叶绿素和可溶蛋白含量以及多酚氧化酶 PPO 和过氧化物酶 POD 活性。叶绿素和可溶性蛋白的合成分别在保存的第 2 和第 4 个月达最高值, 而后降解。胶丸种质呼吸速率被抑制, 随保存时间延长而降低。PPO 活性于保存开始时呈增加趋势, 保存 7 个月时出现最高峰后, 则降低, 但仍较高于初始水平。POD 活性不同, 一开始就急剧下降, 而后逐渐降低。添加蔗糖后, 胶丸种质叶绿素和可溶蛋白含量的变化趋势与没加蔗糖的胶丸种质相似, 但随蔗糖浓度增加, 蛋白含量增加, 而 POD 活性却显著下降; 低浓度 (1.5%) 海藻酸钠和低浓度蔗糖 (0.5%) 表现出有利于缓慢的合成代谢。

关键词 桉树种质 呼吸 叶绿素和可溶蛋白含量 多酚氧化酶和过氧化物酶活性

虽然近年以胶丸形式保存植物种质倍受重视, 但有关研究主要是涉及人工种子低温、短期贮存方法, 而有关保存过程中的生理生化变化研究极少见报道^[1~3], 特别是有关木本植物。在第一篇文章中, 报道了有关巨尾桉 (*Eucalyptus grandis* W. Hillex Maiden \times *E. urqhylla* S. T. Blake) 树种质胶丸保存条件研究^[4,5]。本文是对与逆境生理和代谢调控有关的几个生理指标(呼吸、叶绿素和蛋白含量以及多酚氧化酶活性和过氧化物酶活性)进行检测的结果, 以期了解这些生理指标变化规律及其对种质活力和再生力的作用, 从而为探索常温下种质胶丸保存提供生理生化基础。

1 材料与方 法

1.1 种质准备和保存

从 45 d 的继代苗上切取节段(包括茎尖、第 1 和第 2 个节段)作为种质材料, 胶丸种质准备和保存程序见参考文献[4]。

1.2 呼吸速率测定

采用氧电极法, 使用仪器为 Clark 型氧电极 (Yellow Springs Co. USA), 25 ± 0.5 , 为了防止胶丸在含磷酸根溶液中破裂, 以蒸馏水代替磷酸缓冲液, 测定胶丸吸氧。每次用 8 粒胶丸, 重复 3 次。

1.3 叶绿素含量和可溶蛋白含量测定

采用分光光度计法测定叶绿素, 取 24 粒胶丸, 剥取包于其内的节段, 加 80% 丙酮酸研磨, 定容 3 mL, 4 000 转/min 下离心 10 min, 在吸收波长 652 nm 外比色, 重复 3 次。可溶蛋白含量

1996—07—08 收稿。

曹月华副研究员(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

* 本项研究为 1991~1995 年国家自然科学基金资助项目。生理、生化测试由中国科学院华南植物研究所协助完成, 承蒙林植芳教授提出宝贵意见。刘文明、宋湘豫和郭丽云也参加部分实验工作, 在此一并表示谢意。

是取下述粗酶液用考马斯亮兰法测定,重复 3 次。

1.4 多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)活性测定

从 30 粒胶丸内取节段,加 0.2 mol/L pH6.8 磷酸缓冲液和 80 μg PVP 研磨、过滤,定容 2 mL,10 000 \times g 低温离心 15 min,滤液作酶活测定。

1.4.1 PPO 测定 1 mmol/L 邻苯二酚(6.2 mg 溶于 pH6.8 磷酸缓冲液,定容 50 mL)3 mL + 酶液 0.1 mL。400 nm 处测定吸收值上升^[6]。

1.4.2 POD 测定 0.1 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂, 3 $\mu\text{mol/L}$ 愈创木酚(100 mL 反应中加 10 mmol/L H₂O₂ 1.0 mL,愈创木酚 38 $\mu\text{mol/L}$)。取 3 mL 上述混合液加酶液 0.1 mL,470 nm 测定^[6]。

所有测试均使用德产 H. JURGENS & Co. Spectronic 601 型分光光度计。

2 结果与讨论

2.1 3 种不同部位的节段差异

节段分别按茎尖、第 1 和第 2 节段 3 个不同来源部分分析呼吸速率、叶绿素和可溶蛋白含量以及 POD 和 PPO 活性,由表 1 可见呼吸速率由茎尖顺序至第 2 节段逐渐降低。正相反,叶绿素和可溶蛋白含量以及两种酶的活性从茎尖到第 2 节段逐渐增加。与低成熟度的组织相比,发育阶段幼嫩的茎尖具有较高呼吸速率和低的叶绿素和可溶蛋白含量,这在植物发育中是普遍的现象。这一点与对蔬菜不同部位的叶子的观测结果也是相一致的^[7]。POD 和 PPO 的底物多酚类物质是植物的次生代谢产物,在茎尖 PPO 和 POD 活性低而两个节段的活性高可能与它们的多酚类物质含量不同有关。成熟组织可能积累较多的多酚类物质,并造成很高的 POD 和 PPO 活性。3 种不同来源节段的不同生理状况表明,种质保存处理前,选择种质的来源是重要的。基于上述分析结果,保存种质材料,以选择第 2 和第 1 节段为好。

表 1 3 种不同部位的节段生理生化差异

部 位	呼 吸 ($\mu\text{mol O}_2/10$ 粒)	叶绿素含量 ($\mu\text{g}/10$ 粒)	可溶蛋白含量 ($\text{mg}/10$ 粒)	POD 活性 (单位/10 粒)	PPO 活性 (单位/10 粒)
茎尖	3.15	7.6	0.191	5.8	67.5
节 1	2.88	10.4	0.227	6.7	149.5
节 2	2.60	8.4	0.326	8.7	140.5
平均	2.88	8.8	0.249	7.1	119.1

注:材料为没包裹的裸节段,10 粒=10 个胶丸。

2.2 叶绿素和可溶蛋白含量的变化

图 1A 显示了 1.5%、3.5% 和 5.5% 海藻酸钠胶丸种质的叶绿素含量动态变化曲线,在保存早期,叶绿素含量增加并在第 2 个月时达到最高,而后持续下降。保存 4 个月前,3 种浓度海藻酸钠处理间表现出明显差异,其后差异逐渐消失,其中 1.5% 海藻酸钠浓度处理的叶绿素含量最高。1.5% 和 3.5% 海藻酸钠浓度处理的可溶蛋白含量在保存 4 个月时出现一个高值,而 5.5% 浓度处理在整个保存期(9 个月)中一直呈下降趋势(图 1B),这一结果可能证实 1.5% 海藻酸钠胶丸的透光和通气条件,较有利于维持节段(种质)的“微生长”。然而,尚须进一步对胶丸透光和气体交换进行直接测试。

图 2 显示了在海藻酸钠胶浓度相同(3.5%)的基础上,蔗糖对叶绿素和可溶蛋白含量的影

响。不同蔗糖浓度处理间变化趋势似乎相似于图 1A 的曲线。保存期间,蔗糖没有改变叶绿素和可溶蛋白含量最高值出现的时间。然而,叶绿素含量却随蔗糖浓度的增加而降低,在保存前 6 个月时,处理间差异显著(见图 2A)。在保存前 4 个月,与不加蔗糖处理相比,加蔗糖处理可溶蛋白含量随保存时间延长而呈增加趋势,在 4 个月时达到最高值,其后,在保存的第 4 和第 6 个月间虽呈下降趋势,但仍高于初始水平。已知衰老与蛋白质代谢、酶活调控以及呼吸等生理生化过程有关^[7]。据此,有人在研究叶菜衰老时,以叶绿素和可溶蛋白含量为“衰老指标”,并观察到“离体成熟叶衰老期间,叶绿素和可溶蛋白含量,随贮存时间延长而减少”^[7]。种质保存中活力减低过程似乎亦可视为一种“衰老过程”,而如前述,本实验保存前 6 个月时的观察结果,与叶菜促贮存结果相反。这可能是由于蔗糖为种质提供了合成用的碳源和能量,而缓慢合成代谢的发生是常温条件下长期保存种质活力的生理基础。综合比较,蔗糖对叶绿素和可溶蛋白含量的影响,仍以 0.5% 蔗糖浓度为适宜浓度,这一浓度处理,叶绿素和可溶蛋白含量虽达不到最高值,但均可有相当含量。1.5% 海藻酸钠对叶绿素和可溶蛋白的有利影响与种质活力和再生力的相关资料在前文已提供^[4,5]。基于蔗糖浓度增高的影响,使叶绿素和可溶蛋白含量产生相反的变化,说明种质保存适宜蔗糖浓度的选择应考虑生理指标的综合影响。

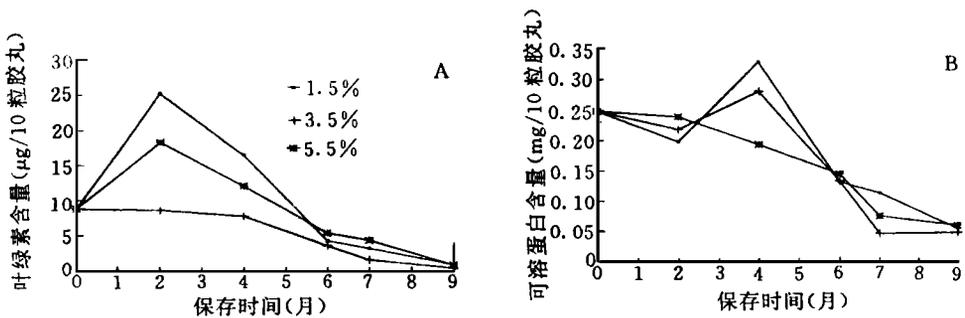


图 1 海藻酸钠浓度对叶绿素和可溶蛋白的影响

(图 1-A、B 图例同)

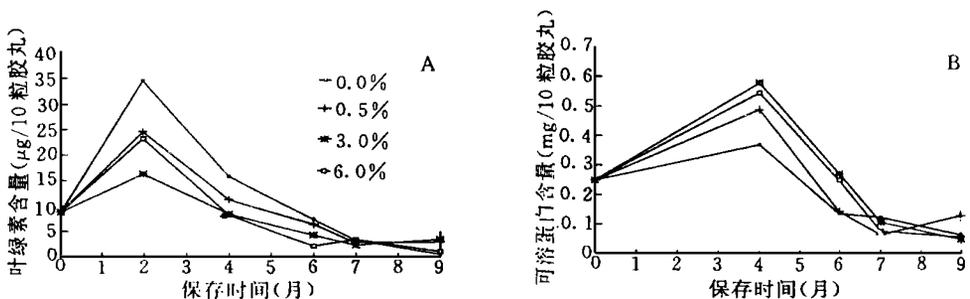


图 2 蔗糖浓度对叶绿素和可溶蛋白含量的影响

(图 2-A、B 图例同)

2.3 PPO 和 POD 活性以及呼吸速率的变化

就海藻酸钠各处理(均未加蔗糖)的 PPO 活性分析显示在保存前两个月呈增加趋势,直到第 7 个月出现最高活性前,一直保持在相似的水平,7 个月后又出现降低(图 3-A),然而, PPO 活性在保存的 9 个月中一直高于初始水平。在保存头 6 个月处理间差异不明显。

加蔗糖的各处理(海藻酸钠浓度为 3.5%) 和对照(不加蔗糖, 海藻酸钠浓度相同) 在保存期间 PPO 活性均呈逐渐增加趋势, 加蔗糖的处理于第 7 个月 PPO 活性达最大值而后迅速下降, 对照 PPO 活性早在第 6 个月就出现了峰值, 后随保存时间延长而降低(图 3-B)。本研究以前报道的结果^[4]已显示, 高糖处理的低再生率的黑色胶丸比率高, 正相反, 低糖和无糖处理的较高再生率的绿色胶丸比率也高^[4-5]。从下页表 4 可看出, 黑色胶丸 PPO 酶活低, 至保存第 9 个月时已失去酶活。因此, 高糖处理的 PPO 活性较低(图 3-B)。在种质保存中, 供给低浓度蔗糖(0.5%) 既可保持较高种质再生率又可维持一定的 PPO 酶活, 比较适宜。

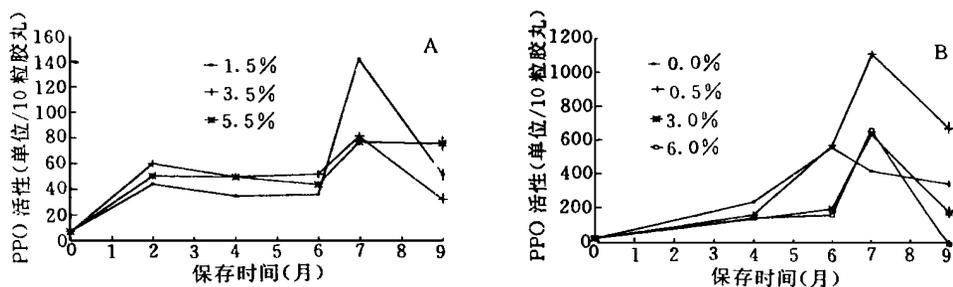


图3 海藻酸钠浓度(A)和蔗糖浓度(B)对 PPO 活性的影响

PPO 和 POD 是参与植物多酚类物质代谢的酶类。酚类物质的氧化和醌的聚合经常造成植物的褐化^[6,8,9], 有报道指出荔枝果皮的颜色是被 PPO 酶活性所影响并且褐化^[6]。我们和国外的研究均观察到, 富含酚类物质的桉树组培物亦常发生酚类物质氧化和醌的聚合, 造成组培物的黑化, 黑化严重时会使组培物致死^[10], 桉树种质保存中胶丸种质变黑与活力降低相关联^[4,5], 胶丸种质变黑与组培物的黑化是否为同一因子所致, 是否与 PPO 反应相关, 有待进一步研究。

在胁迫条件下, 脂类过氧化是生物膜损坏的主要过程之一。POD 是防止膜脂过氧化作用的酶系统中的一个重要保护酶^[6,8,9,11]。海藻酸钠和蔗糖对 POD 影响结果见图 4。没包埋的节段(种质材料), 初始的 POD 活性是相当高的, 当用不同浓度的海藻酸钠胶包成胶丸种质后, 在保存头两个月后 POD 活性急剧下降, 后随时间延长活性降低缓慢。在保存末期, 1.5% 和 5.5% 海藻酸钠处理的 POD 活性仅为初始的 1/14 ~ 1/10(图 4-A)。另一方面, 加蔗糖处理, POD 活性随保存时间延长而降低。在保存早期(4 个月前), 随蔗糖浓度增加, POD 活性降低是明显的(图 4-B)。有关杏果贮存研究中, 也观测到 POD 活性呈相似降低趋势^[12]。而有关低温下保存胡

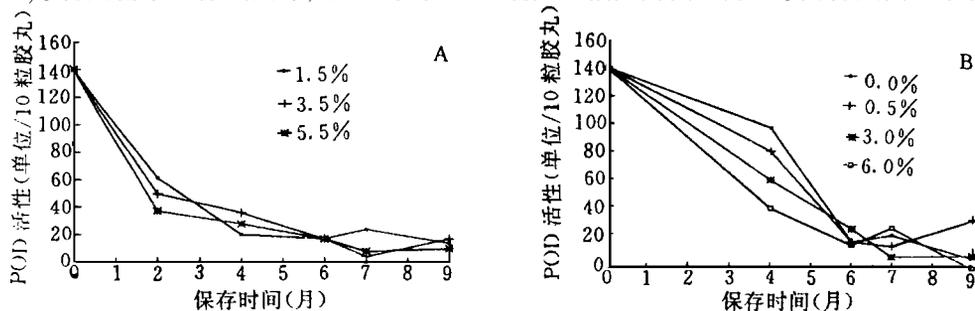


图4 海藻酸钠浓度(A)和蔗糖浓度(B)对 POD 活性的影响

萝卜人工种子的 POD 活性却显示高于裸胚^[1], 显然, 进一步的研究是必要的。

胶丸种质呼吸速率随保存时间延长而降低。在高浓度(3.5% ~ 5.5%)海藻酸钠处理中, 呼吸速率下降更为迅速, 特别是在保存的头4个月。在保存结束时, 不同浓度海藻酸钠胶丸种质的呼吸速率全部降为初始的24% ~ 28%(图5-A)。基液(配制海藻酸钠胶液的营养液)中加入蔗糖具有延缓呼吸速率作用(图5-B), 其中以3%和6%蔗糖处理为明显。蔗糖刺激呼吸可能是由于蔗糖提供了呼吸的底物。3%和6%蔗糖诱导了较高的呼吸速率, 但并没有产生高的种质活力。所观测到的整个保存期间桉树胶丸种质呼吸变化图式与胡萝卜等人工种子不一样^[1]。需要进一步研究产生不同结果的原因。

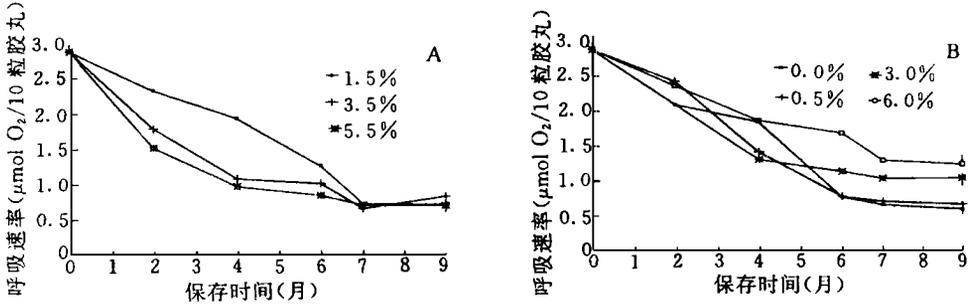


图5 海藻酸钠浓度(A)和蔗糖浓度(B)对呼吸速率的影响

2.4 基液的影响

当以水配制海藻酸钠胶液时, 胶丸种质的叶绿素和可溶蛋白含量、呼吸速率以及 PPO 和 POD 活性显著较以 MSR 基液(1/4MS 无机大量元素+ 2 倍有机微量元素+ 0.1 mg 6-BA) 配制海藻酸钠胶液处理的低。有 MSR 液时, 叶绿素和可溶蛋白含量增加了 103.8% 和 32.6%, 呼吸速率以及 PPO 和 POD 活性也分别增加了 20%、83% 和 99%。当 0.5% 蔗糖加到 MSR 基液中(即 MSRC 基液), 呼吸速率和可溶蛋白含量升高到一个新水平, 而叶绿素以及 PPO 或 POD 活性却降低了(表 3), 但再生率最高^[4,5]。这表明适宜的低浓度的营养对于控制呼吸和种质的叶绿素和蛋白代谢, 对维持长期保存中的“微生长”是必要的。

2.5 PPO 和 POD 活性与胶丸颜色

在保存 9 个月时, 从不同处理, 按胶丸颜色, 随机选取的胶丸样品的测试结果(表 4)可见, 黑色和白色种质胶丸, 两种酶已无明显活性, 绿色胶丸(包括黄绿色)和黑绿色(节段上绿下黑)以及黑红种质胶丸都表现出一定的 PPO 和 POD 活性, 再生率超过 40%, 并有相当含量的叶绿素和可溶蛋白^[4,5]。显然,

种质活力在一定程度上, 可通过 PPO 和 POD 活性加以表现。因为在衰老组织中, 蛋白质的降

表 3 基液对种质胶丸生理性状的影响

基液	呼吸速率 ($\mu\text{mol O}_2/10$ 粒)	叶绿素 含量 ($\mu\text{g}/10$ 粒)	可溶蛋白 含量 ($\text{mg}/10$ 粒)	PPO 活性 (单位/10 粒)	POD 活性 (单位/10 粒)
水	1.21	7.8	0.282	49.7	49.7
MSR	1.49	15.9	0.374	91.0	99.3
MSRC	1.85	11.3	0.493	82.6	82.6

表 4 不同颜色种质胶丸 PPO 和 POD 活性比较

胶丸颜色	PPO 活性 (单位/10 粒)	POD 活性 (单位/10 粒)	再生率 (%)
绿(+ 黄绿)	36.4	109.2	42
黑绿	32.0	119.0	56
黑红	28.9	200.5	40
黑	3.5	3.5	23
白	0.0	0.0	2

解常导致酶蛋白还原和酶活降低。黑色胶丸中发生的黑化可能是由于在保存早期出现高的 PPO 活性之故, 6% 蔗糖处理胶丸的叶绿素含量明显下降, 同时出现黑色胶丸很高的百分比现象^[4, 5], 这可能是由于糖类与一些 -NH₂ 而产生的黑色物质所致。

参 考 文 献

- 1 吕越峰, 李修庆. 人工种子干燥处理对胡萝卜体胚超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化物歧化酶活性的影响. 见: 李修庆主编. 植物人工种子研究. 北京: 北京大学出版社, 1990. 94 ~ 95.
- 2 陈德福, 程炳嵩, 王韵, 等. 根芹人工种子在液体石蜡中的生长及其生理生化研究. 见: 李修庆主编. 植物人工种子研究. 北京: 北京大学出版社, 1990. 96 ~ 102.
- 3 Kim Y H, Janick. ABA and polyox-encapsulation on high humidity increases survival of desiccated somatic embryos of oleria. Hort. Sciences, 1989, 24(4): 674 ~ 676.
- 4 曹月华, 刘文明. 巨尾桉(*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) 种质胶丸常温保存条件研究. 林业科学研究, 1995, 8(4): 367 ~ 372.
- 5 Cao Yuehua, Liu Wenming. Studied on the conservation of *Eucalyptus* germplasm in alginate beads at room temperature. I. Conservation of condition. In: "Forest Tree Improvement in the Asia-Pacific Region" Edited by Xihuan Shen, Published by China Forestry House, Beijing, 1995. 258 ~ 263.
- 6 林植芳, 李双顺, 张东林, 等. 采后荔枝果皮色素总酚及有关酶活性的变化. 植物学报, 1989, 30(1): 40 ~ 45.
- 7 张丽欣, 宗汝静. 四种叶菜衰老期间呼吸乙烯产生和过氧化物酶的变化及其相互关系. 植物生理学报, 1988, 14(1): 81 ~ 87.
- 8 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 的累积与膜脂过氧化物的关系. 植物生理学报, 1988, 14(1): 16 ~ 22.
- 9 刘淑娴, 蒋跃明, 陈芳, 等. 荔枝果皮褐变与多酚氧化酶过氧化物酶的酚类物质的区域化分布的关系. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1991, 第 7 集: 95 ~ 98.
- 10 Le Roux J J, van Staden J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*—a review. Tree Physiology, 1991, 9(4): 435 ~ 478.
- 11 陈少裕. 膜过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84 ~ 90.
- 12 任小林, 李嘉瑞. 杏果实成熟衰老过程中活性氧和几种生理指标的变化. 植物生理学通讯, 1991, 27(1): 34 ~ 64.

Studies on the Changes of Physiological Properties of Conservation of *Eucalyptus* Germplasm Encapsulated in Alginate Beads at Room Temperature

Cao Yuehua

Abstract Respiration, chlorophyll, soluble protein, activities of peroxiase(POD) and polyphenol oxidase(PPO) during the 9 months conservation of *Eucalyptus* microcuttings encapsulated in alginate beads were examined. The synthesis of chlorophyll and protein occurred in alginate beads of microcuttings of *Eucalyptus* during the earlier stage of conservation. The maximum chlorophyll and soluble protein were found in the second month or fourth month, respectively, then degraded. Respiration of microcuttings in alginate gel beads was inhibited and decreased with conservation time. The activity of PPO increased at first, then decreased in the end of conservation, but the activity of POD suddenly dropped in the beginning, then reduced slowly. When sucrose was added to the alginate gel, the change patterns of chlorophyll and soluble protein in the microcuttings were similar to that of sucrose-free gel, but protein content increased and the POD activity showed a marked reduction with the increasing concentration of sucrose. The results indicated that low concentration of alginate(1.5%) and sucrose(0.5%) were favored to the slow synthetic metabolism, which might be as the physiology base of storing microcuttings of *Eucalyptus* under "minimal growth" condition of tissue culture.

Key words *Eucalyptus* germplasm respiration contents of chlorophyll and soluble protein activities of polyphenol oxidase and peroxidase